N° 22. **R. Martin**[1] **und P. Tardent,** — Kultur von Hydroiden-Zellen in vitro. (Mit 2 Tafeln.)

Stazione Zoologica, Napoli und Zoologisches Institut der Universität Zürich.

1. Einleitung

Die Interpretation der aussergewöhnlichen morphogenetischen Potenzen der Coelenteraten bietet grosse Schwierigkeiten, weil u.a. die formbildenden Prozesse auf zellulärer Ebene bis jetzt entweder nur am fixierten Objekt oder nur unter ungünstigen technischen Voraussetzungen am lebenden Tier beobachtet werden konnten (Tardent 1963). Es handelt sich in erster Linie darum, die morphogenetischen Potenzen einzelner Zelltypen zu ermitteln. Die wenigen Versuche, dieses Problem auf dem Wege der Gewebs- und Zellkulturen zu lösen, sind grossen technischen Schwierigkeiten begegnet und haben noch keine schlüssigen Resultate gezeitigt (Sanyal und Mookerjee 1960, Phillips 1961).

Seit zwei Jahren haben wir an der Zoologischen Station von Neapel, in Zusammenarbeit mit Dr. A. Necco, die zahlreichen methodischen Hindernisse zu überwinden versucht, die sich einer „in vitro" — Kultur von Geweben und Zellen mariner Invertebraten in den Weg stellen (vergl. Necco und Martin 1963). Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die neuesten Beobachtungen an Reinkulturen von Cnidoblasten der kolonialen Hydroide *Tubularia larynx*.

Die in verschiedenen Typen auftretenden Nesselzellen sind bei *Tubularia* in der ganzen ektodermalen Schicht verteilt, wo sie in kleinen Gruppen an der Basis der Epithelmuskelzellen liegen (Tardent und Eymann 1959). Die zahlreichen, im Stielteil (Hydrocaulus) lokalisierten Nematoblasten bilden, da sie durch das Aussenskelett am Ausüben ihrer Funktion gehindert werden, eine dem Hydranthen bestimmte Reserve (Hadzì 1909).

[1] Diese Arbeit wurde durch die grosszügige Unterstützung der „National Institutes of Health in Bethesda Maryland USA" (Kontrakt C 3402) ermöglicht.

Die Cnidoblasten sind zu ausgedehnten Wanderungen befähigt, wobei sie sich amoeboid zwischen den Epithelmuskelzellen bewegen (Tardent und Eymann 1959). Nach den Beobachtungen von Lehn (1951) führt ihre Differenzierungsgeschichte auf die interstitiellen Zellen zurück, die auch noch zu anderen Differenzierungsleistungen fähig sind (Tardent 1963). Die strukturellen Aspekte der komplexen Nematocysten-Differenzierung wurden kürzlich von Slautterback und Fawcett (1959) elektronenoptisch untersucht.

2. Material und Methode

Das für die Kulturen verwendete, alle ektodermalen und entodermalen Zelltypen enthaltende Coenosarcmaterial wird sorgfältig aus dem Hydrocaulus herausgepresst, nachdem dieser von Epibionten befreit und einer 24-stündigen Behandlung mit Antibiotica ausgesetzt wurde. Die auf diese Weise isolierten Gewebsfragmente werden in ein halbsynthetisches Medium übertragen. Dieses besteht aus: Natürlichem gepuffertem Meerwasser (pH 7.5), dem die Aminosäuren Serin, Taurin und Glycin (Faulhaber und Tardent 1959) sowie Hefeextrakt („Yeastolate", „Difco") und Glucose beigefügt wurden. Diese Lösung wird in Kombination mit Blutplasma der Languste *(Palinurus vulgaris)* verwendet. Dieses hat bakteriostatische Eigenschaften und bildet lockere Koagulate, in denen sich die Zellen festsetzen. Als Kulturtechnik wird das Verfahren des hängenden Tropfens und der „roller tubes" angewendet.

3. Ergebnisse

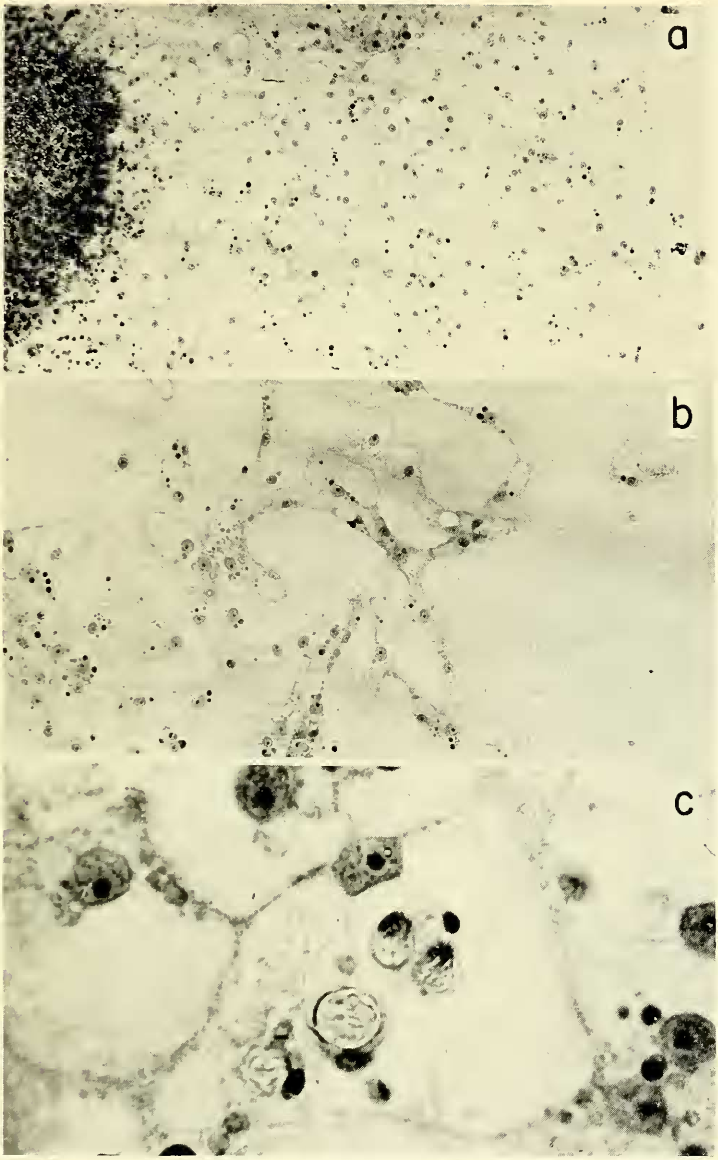
Die ersten 24 Stunden nach Ansetzen der Kulturen sind durch eine rege Wanderung der Zellen gekennzeichnet, wobei diese das Explantat verlassen und sich zentrifugal über die mit Plasmakoagulat bedeckte Glasfläche ausbreiten (Abb. 1a). Es betrifft dies vor allem die grossen entodermalen Epithelmuskelzellen, die grosse Vakuolen einschliessen und z.T. schlagende Geisseln tragen (Abb. 1b). Sie sind in diesem Zustand stark abgeflacht und bilden ein Netzwerk, in dem die einzelnen Zellen unter sich einen engen Kontakt aufrechterhalten. Auffallenderweise liegen von Anfang an, vor allem aber einige Tage nach Kulturbeginn, dicht neben den Kernen dieser Zellen kleine Gruppen von Cnidoblasten mit Nematocysten unterschiedlichen Entwicklungsgrades (Abb. 1c). Ob diese Cnidoblasten zusammen mit den anderen Zellen aus dem

Explantat ausgewandert sind oder ob sie sich an Ort und Stelle differenziert haben, ist noch nicht abgeklärt.

Diese Primärkulturen, in denen mehrere Zelltypen vertreten sind, zeigen meistens nach 4-5 Tagen, spätestens aber nach 8 Tagen, Depressionserscheinungen, die sich dadurch äussern, dass die bisher abgeflachten Zellen eine Kugelform annehmen und sich von der Unterlage ablösen. Eine kleine Zahl von Cnidoblasten überdauert diesen Zerfallsprozess. Diese beginnen sich nach 2-3 Tagen plötzlich ausserordentlich stark zu vermehren, sodass die Wände der rotierenden Röhrchen schon ein bis zwei Tage später dicht mit Cnidoblasten besetzt sind. Die relativ lange Zeitspanne, die zwischen dem Kulturbeginn und der explosionsartigen Vermehrung dieser Zellen liegt, kann als Anpassungsperiode interpretiert werden; eine Erscheinung, die bei Gewebekulturen häufig auftritt. Wie die Abbildung 2 a zeigt, enthalten die Kulturen von diesem Zeitpunkt an nur noch Cnidoblasten. Nachkommen dieser Zellen leben seit 50 Tagen in 4 verschiedenen Stämmen in Reinkultur, ohne dass sich die sehr hohe Vermehrungsrate verändert hätte.

Nach wöchentlich einmaliger Erneuerung des Kulturmediums finden sich nach 32 Kulturtagen — 2 Tage nach der letzten Erneuerung — kleine, langgestreckte ovale Zellen, deren basophiles Plasma kleine, optisch leere Blasen aufweist (Abb. 2b). Es handelt sich um frühe Differenzierungsstadien von Cnidoblasten. Nach weiteren 2 Tagen haben sich in der gleichen Kultur Grösse und Struktur eines Teiles dieser Zellen verändert (Abb. 2c). Das Bläschen im Plasma ist herangewachsen und hat die Form einer Penetrante angenommen, die noch mit basophilem Plasma überzogen ist. Der Kern wird, wie es für weitgehend differenzierte Cnidoblasten charakteristisch ist, durch die heranwachsende Kapsel verdrängt.

Ueberraschenderweise konnte festgestellt werden, dass sich diese Cnidoblasten in diesem fortgeschrittenen Differenzierungsstadium noch mehrmals teilen. Es finden sich nämlich als Teilungsprodukte zahlreiche Zweier-, seltener auch Dreier- und Verergruppen, die zunächst noch von einer gemeinsamen Plasmahülle umgeben sind (Abb. 2c). In gefärbten Präparaten von solchen Kulturen finden sich oft freie Kapseln ohne Kern und Plasma, die offenbar von der Zelle ausgestossen wurden. Es gilt noch abzuklären, ob ein und dieselbe Zelle nacheinander mehrere

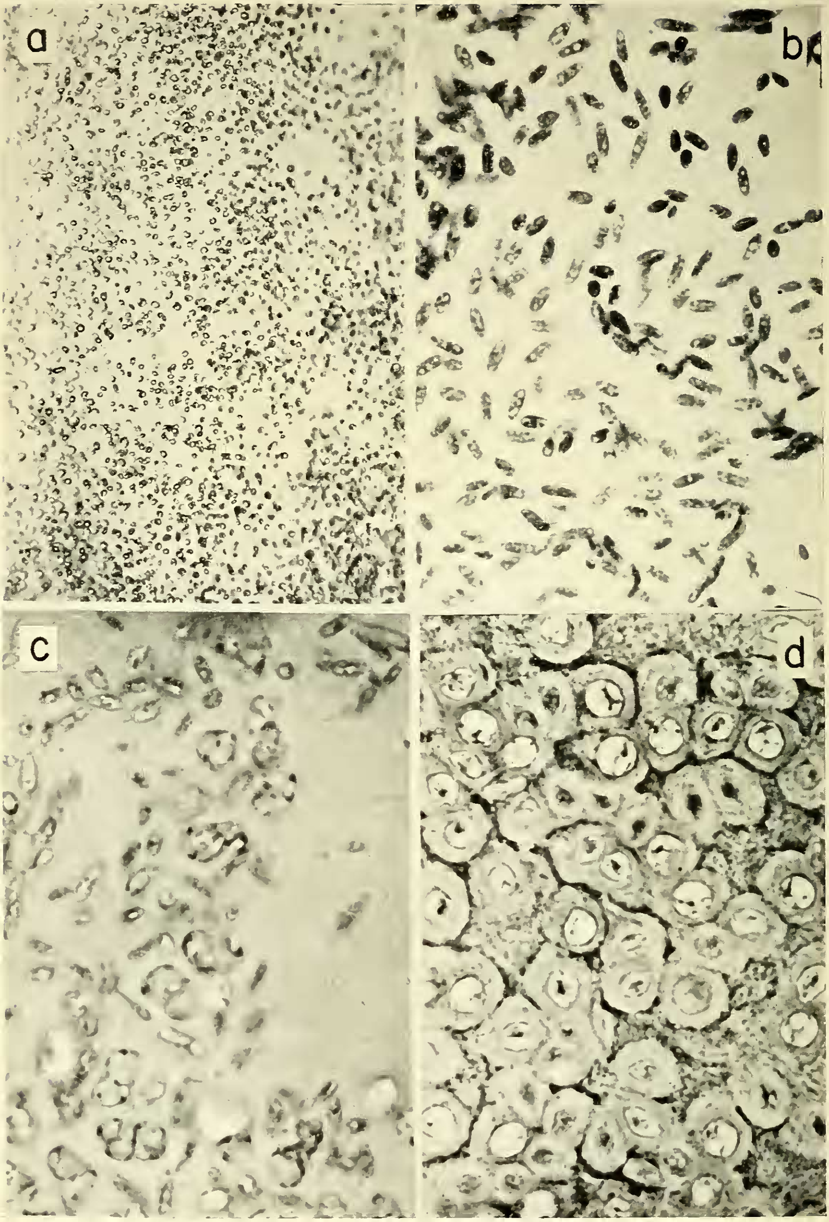


Eine 4-tägige Kultur eines Coenosarcstückes von *Tubularia* mit ausgewanderten Epithelmuskelzellen.

a) Das Explantat mit ausgewanderten Zellen (300 x, Häm. Eos.).

b) Detail der Abb. 1 a (480 x, Häm. Eos.).

c) Eine Epithelmuskelzelle des gleichen Präparates mit einer Gruppe von 7 Cnidoblasten (1230 x, Häm. Eos.).



Reinkulturen von Cnidoblasten.

a) Lebendaufnahme einer 21 Tage alten Kultur, in „roller tubes" (480 x).

b) 32 Tage alte Kultur bestehend aus undifferenzierten Cnidoblasten, 2 Tage nach Erneuerung des Mediums (1230 x, Häm. Eos.).

c) 34 Tage alte Kultur von weitgehend differenzierten Cnidoblasten, Medium 4 Tage vorher gewechselt (1230 x, Häm. Eos.).

d) Cnidoblasten mit weitgehend differenzierten Nematocysten, 11 Tage alte Kultur, Medium nicht erneuert (1230 x, Häm. Eos.).